
研究助成業績報告集

第 25 回（2017 年度）バイエル循環器病研究助成
『血栓症予防・治療における新しいアプローチ』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	経カテーテル的大動脈弁留置術を施行する重症大動脈弁狭窄症例における新規血栓形成能モニタリングシステムの有用性に関する検討	石井 正将	1
2	血栓性脳梗塞慢性期の機能回復を促進するミクログリア療法の確立	金澤 雅人	9
3	経カテーテル大動脈弁留置術(TAVI) 後の経口抗凝固薬療法の確立	川本 尚紀	15
4	心臓マクロファージを基軸とする新規心内血栓形成機序の解明と新規治療標的の検索	藤生 克仁	20

経カテーテル的大動脈弁留置術を施行する重症大動脈弁狭窄症例における新規血栓形成能モニタリングシステムの有用性に関する検討

熊本大学大学院生命科学研究部循環器内科学
京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻薬剤疫学
石井 正 将

I. 緒 言

従来、重症大動脈弁狭窄症に対する侵襲的治療としては外科的大動脈弁置換術が主流であり、高齢で合併症が多く、手術リスクの高い患者は、手術が困難であったが、経カテーテル的大動脈弁留置術 (Transcatheter Aortic Valve Implantation; TAVI) の普及により高リスクの患者でも治療可能となってきた。しかしながら TAVI 後の出血性合併症は1年以内の死亡率の強い関連因子であることが報告されており(1)、出血性合併症に対するリスクコントロールは解決すべき課題である。また重症大動脈弁狭窄症に合併する消化管出血 (Heyde 症候群) は、その原因が大動脈弁狭窄部での高ずり応力により von Willebrand 因子(vWF)高分子量マルチマーが減少して生じる後天性 von Willebrand 症候群であることが知られており(2,3)、大動脈弁狭窄症自体が出血の高リスクである。そのため、TAVI の周術期並びに遠隔期の出血性合併症のリスクを評価することが重要であるが、いまだモニタリングシステムが確立していないのが現状である。

近年、動脈硬化病巣を模したマイクロチップ内における白色血栓形成の過程を動脈もしくは静脈内の血流条件下に総合的かつ、定量的に解析する Total Thrombus-Formation Analysis System(以下、TTAS)が登場し、ごく少量の全血で容易に血栓形成能を評価することができるようになった。使用するマイクロチップには 2 種類あり、AR-chip (Atheroma chip)はフィブリンと活性化血小板を主成分とする混合白色血栓の解析、PL-chip (Platelet chip)は活性化血小板を主体とする血小板形成の解析が可能である。白色血栓の成長速度や安定性を、圧力波形により定量評価することが可能で、経時的

に測定された圧力曲線の Area under the curve (AR-AUC, PL-AUC)を測定することで、血栓形成能の定量的評価が可能である。TTAS を用いた検討では、von Willebrand disease の診断や重症度評価を定量的に行えることが示されている(4,5)。よって、高ずり応力により vWF 高分子量マルチマーが欠損し、出血傾向を示す重症大動脈弁狭窄症にも十分応用可能と考える。当施設においても TTAS を用いて direct oral anticoagulant (DOAC) である Edoxaban 服用患者の抗凝固能の定量評価としての有用性(6)や、冠動脈疾患で抗血小板療法を施行している患者の抗血小板効果の評価に有用であること(7)を報告してきた。また心房細動に対するカテーテルアブレーション周術期の出血合併症の予測に TTAS で測定した AR-AUC が有用であること(8)も報告している。以上より、TAVI 周術期の出血合併症の予測に、TTAS パラメータ (AR-AUC、PL-AUC) が有用である可能性がある。

さらに上述したように大動脈弁狭窄症では、その高ずり応力が出血傾向と関連しているが、ずり応力により発現が制御されている mechanosensitive athero-microRNA が知られており(9)、大動脈弁狭窄症例においてもいくつかの microRNA の発現が上昇ないし低下しており、新規のバイオマーカーや治療ターゲットとなる可能性が報告されている(10)。本研究では、TAVI 施行前後で変動する microRNA を模索するとともに、造影 CT を Computational Fluid Dynamics (CFD)の技術を用いてシェアストレスの解析も行う。すなわち、TAVI 施行前後でのシェアストレスの変動による microRNA の遺伝子発現の変化と、TTAS による血栓形成能および凝固能の変化との関連を評価する。

II. 対象・方法

【研究デザイン】前向き観察研究 (NCT03248232)

【対象患者】2017年8月から2018年3月の間に熊本大学医学部附属病院に入院して重症大動脈弁狭窄症で TAVI を施行した患者を登録した。除外基準は以下の通り; 同意の得られなかったもの、同意撤回のもの、経心尖部アプローチ症例、膠原病、DIC、敗血症など重篤な状態。

【評価項目】

(主要評価項目)

TAVI 施行前後での凝固能(AR-chip)および血小板機能(PL-chip)の経時的変化や従来の血小板機能マーカーや凝固マーカーとの比較、TAVI 施行前後でのシェアストレスおよび microRNA の変動と凝固能、血小板機能の比較。

(副次評価項目)

TAVI 術後合併症 (1 週間後): デバイス不良、主要血管合併症、出血合併症、新規ペースメーカー植え込み術もしくは伝導障害の出現、開胸手術への移行、心タンポナーデ、急性腎障害、弁塞栓症、冠動脈閉塞、大動脈破裂

TAVI 術後合併症 (1 ヶ月後): 全死亡、心血管死、脳梗塞、一過性脳虚血発作、心筋梗塞、急性腎障害、出血合併症、ペースメーカー植え込み術、心不全増悪

【患者背景情報の取得】

背景因子 (性別、生年月日、既往歴、家族歴、生活歴 (喫煙、アルコール)、入院時および退院時内服薬)、心エコーデータ (左室駆出率、左室径、壁厚、大動脈弁弁口面積、圧較差、弁通過速度など)、リスクパラメータ (Logistic Euroscore, Euroscore II, STS score, Clinical Frailty Scale) をカルテ情報より収集した。

【検体収集】

TAVI 施行前日、施行 48 時間後、1 週間後、1 ヶ月後に肘静脈より血液検体を採取し、T-TAS パラメータ (AR-AUC、PL-AUC)、PT-INR、APTT、血算、一般生化学を測定した。血漿検体は凍結保存し、後日、一括して血漿トロンボポエチン濃度測定、vWF 高分子量マルチマー解析、血漿 microRNA のリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

【T-TAS の測定方法】

AR-chip は 1 型コラーゲンと組織トロンボプラスチンが塗布してある幅 300 μ m、深さ 80 μ m の 1 本の流路である。全血を 3.2%クエン酸採血管に採取。測

定直前に CaCl₂ とコーントリプシンインヒビターと混合させる。そのうち 450 μ L を flow rate 10 μ L/min (initial wall shear rate 600 /sec) で流して血栓形成を観察する。回路が閉塞する過程を圧波形でモニタリングし、経時的に測定された圧力曲線の 30 分間の Area under the curve を AR₁₀-AUC₃₀ と表す。PL-chip は、1 型コラーゲンが塗布してある幅 40 μ m、深さ 40 μ m の capillary を 25 本含むマイクロチップである。全血をヒルジン入りの採血管に入れ 1 時間静置後、330 μ L の全血を flow rate 24 μ L/min (initial wall shear rate 2000 /sec) で流して血栓形成を観察する。回路が閉塞する過程を圧波形でモニタリングし、経時的に測定された圧力曲線の 10 分間の Area under the curve を PL₂₄-AUC₁₀ と表す。

【vWF 高分子量マルチマー解析】

保存血漿検体 (クエン酸採血) を株式会社 SRL に委託し、解析を行った。手順は以下の通り。検体を SDS で変成処理後、SDS を含んだアガロースゲル内を電気泳動させた。泳動終了後、ゲルを固定し、直接ゲル上でペルオキシダーゼ標識抗体を反応させ、発色試薬で染色した。Image J にて定量化し、multimer の割合を正常血漿との比で算出した。

【血漿トロンボポエチンの測定】

保存血漿検体を室温に融解後、Abcam Human Thrombopoietin ELISA kit (ab219632)を用いてトロンボポエチンの血漿濃度を ELISA 法にて測定した。

【CFD 解析】

TAVI 施行前、TAVI 施行 1 週間後の造影 MDCT 画像を Cardio Flow Design 社に委託して flow, shear stress の解析を行った。手順は以下の通り。CT 画像より、大動脈弁位から下行胸部大動脈までの 3D 画像を構築し、ソフトウェア ANSYS Fluent 18.0 を用いて空間を微小な領域の集合 (メッシュ) に分割した。CT 撮像時の血圧や経胸壁心臓超音波検査で測定した弁通過血流量を設定し、隣接するメッシュ間で質量と運動量を保存させるようにナビエ・ストークス方程式を近似的に計算し、TAVI 前後での大動脈弁および大動脈後壁にかかるシェアストレス (WSS: wall shear stress) の収縮期および拡張期における最大値を算出した。

【microRNA のリアルタイム RT-PCR 測定】

保存血漿検体より miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN)を用いて microRNA を抽

出後、cDNAに変換。SYBR green assayを用いて下記のprimerにより標的microRNAの定量を行った。miR-122-5p (Cat.No./ID MS00003416)、miR-625-5p (Cat.No./ID MS00033894)、miR-200c-3p (Cat.No./ID MS00003752)、miR-30e-5p (Cat.No./ID MS00009401)、miR-423-3p (Cat.No./ID MS00004179)は内部コントロールに使用した。

【統計解析】

患者背景、検査データ、処方薬剤、手技に関する因子を、記述統計の手法を用いて要約する。カテゴリー変数は数と割合、連続変数は中央値と4分位範囲を用いて要約する。TAVI施行前後の経時的観測データに関しては、ウィルコクソンの符号付き順位検定またはフリードマン検定を行い、群間の多重比較についてはボンフェローニ法にて補正した。血栓形成性に及ぼす因子を検討するために、各パラメーターとAR-AUCの相関関係を調べた。欠測データについては多重代入法を用いて解析を行った。両側5%を有意水準とし、統計ソフトSPSS ver23を用いた。

III. 結果

【患者背景】

2017年8月から2018年3月までの間に熊本大学医学部附属病院に入院し、重症大動脈弁狭窄症でTAVIを施行した連続症例23例を登録した。そのうち2例は検体採取困難で除外とした。本研究の患者背景を表1に示す。年齢は中央値87歳で女性は57.1%であった。術前の大動脈弁の平均圧較差の中央値は48.2mmHg、弁口面積は0.53cm²であった。リスクスコアであるEuroSCORE IIの中央値は3.72%、Clinical Frailty Scaleの中央値は4であった。

表1 患者背景

	Overall (n=21)
Patient characteristics	
Age, years	87.0 [84.0-90.5]
Female	12 (57.1)
Body surface area, m ²	1.43 [1.31-1.57]
Body mass index	23.2 [19.9-24.9]
NYHA class III or IV	6 (28.6)
Diabetes	5 (23.8)

Hypertension	18 (85.7)
Dyslipidemia	13 (61.9)
Coronary artery disease	12 (57.1)
Previous myocardial infarction	3 (14.3)
Previous stroke	3 (14.3)
Previous PCI	9 (42.9)
Previous CABG	0 (0)
Peripheral artery disease	2 (9.5)
Atrial fibrillation	6 (28.6)
Chronic obstructive pulmonary disease	3 (14.3)
Pulmonary hypertension	3 (14.3)
STS score, %	8.373 [5.965-10.631]
Logistic EuroSCORE, %	13.57 [9.09-23.20]
EuroSCORE II, %	3.72 [2.67-4.63]
Clinical Frailty Scale	4 [4-4]
Laboratory data	
Crea, mg/dL	1.12 [0.88-1.44]
Alb, g/dL	3.7 [3.6-4.0]
PT-INR	1.09 [1.01-1.39]
APTT, sec	30.6 [28.4-36.3]
D-dimer, μ g/mL	1.70 [0.98-3.20]
Hgb, g/dL	10.8 [9.75-11.8]
Plt, $\times 10^3/\mu$ L	170 [139-212]
BNP, pg/mL	357.4 [126.5-534.1]
Echocardiographic parameters	
Left ventricular ejection fraction, %	61.4 [50.5-65.3]
Aortic valve area, cm ²	0.53 [0.45-0.66]
Mean pressure gradient, mmHg	48.2 [37.8-65.4]
Max velocity, m/sec	4.57 [4.12-5.20]
Mean velocity, m/sec	3.20 [2.81-3.96]
TRPG, mmHg	26 [23-36]
Aortic regurgitation \geq mild	14 (66.7)
Mitral regurgitation \geq mild	11 (52.4)
Medication before TAVI	
Aspirin	17 (81.0)
Clopidogrel	7 (33.3)
Prasugrel	1 (4.8)
DAPT	7 (33.3)

Warfarin	3 (14.3)
DOACs	3 (14.3)
ACE inhibitor / ARB	17 (81.0)
β -blockers	5 (23.8)
CCBs	9 (42.9)
Statins	10 (47.6)
Proton pump inhibitors	17 (81.0)
Medication after TAVI	
Aspirin	20 (95.2)
Clopidogrel	14 (66.7)
Prasugrel	1 (4.8)
DAPT	14 (66.7)
Warfarin	3 (14.3)
DOACs	3 (14.3)
ACE inhibitor / ARB	17 (81.0)
β blockers	4 (19.0)
CCBs	13 (61.9)
statins	10 (47.6)
Proton pump inhibitors	19 (90.5)

【手技に関する背景因子】

表 2 に TAVI の手技に関する背景因子を示す。本研究に参加した患者においては全例、経大腿動脈アプローチであった。経カテーテル的人工弁は、Sapien 3 23mm, 26mm がそれぞれ 6 例ずつ、Evolut R が 23mm 3 例、26mm 2 例、29mm 4 例であった。

表 2 手技に関する背景と術後のエコー所見

Overall (n=21)	
Transcatheter valves	
Sapien 3	
23mm	6 (28.6)
26mm	6 (28.6)
29mm	0 (0.0)
Evolut R	
23mm	3 (14.3)
26mm	2 (9.5)
29mm	4 (19.0)
Approach	
Transfemoral	21 (100)
Transapical	0 (0.0)

Echo parameters after TAVI (POD7)	
Mean pressure gradient, mmHg	11.3 [9.7-12.9]
Max velocity, m/sec	2.45 [2.05-2.63]
Mean velocity, mmHg	1.54 [1.39-1.63]
Aortic regurgitation \geq mild	10 (47.6)
Mitral regurgitation \geq mild	12 (57.1)

【血栓形成能、凝固マーカー、血算の経時的変化】
血栓形成能に関するパラメータを TAVI 前日、48 時間後、1 週間後、1 カ月後に計測した(図 1)。AR10-AUC30 は、TAVI 前より 48 時間後に有意に低下し、1 カ月後には有意に上昇し、術前と有意差を認めなかった。vWF 高分子量マルチマーは術前に比べ 48 時間後に有意に上昇していたが、1 週間後、1 カ月後は有意ではないものの上昇傾向であった。APTT は術前に比べ 48 時間後に有意に延長し、1 カ月後には低下していた。D-dimer は術前に比べ 1 週間後をピークに上昇し、1 カ月後には低下していた。Hgb は術後 48 時間後、1 週間後に比べ、1 カ月後に有意に上昇していた。血小板数は 48 時間後に最も低下し、1 週間後、1 カ月後には再上昇していたが、術前に比べると有意に低かった。血漿トロンボポエチンは術前に比べ 48 時間後、1 カ月後に有意に上昇していた。PL24-AUC10、PT-INR は有意な変化を認めなかった。

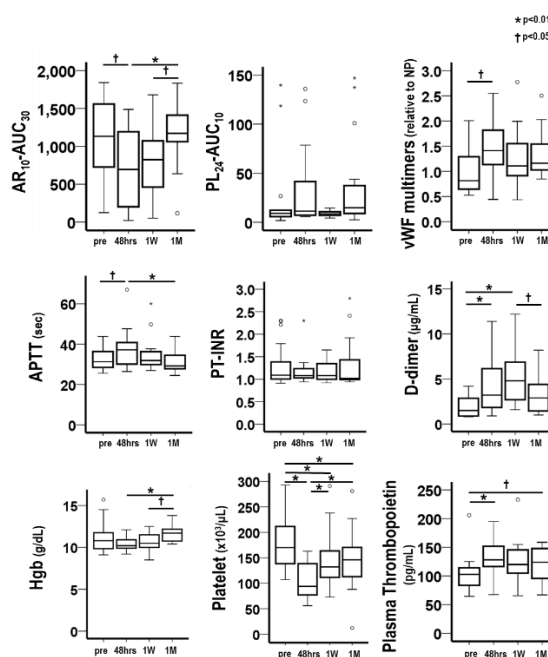


図 1 TAVI パラメータ、凝固マーカー、血算、vWF multimer、トロンボポエチンの経時的変化

【CFD 解析によるシェアストレスの変化】

本研究の対象者で腎機能が保たれていた 5 症例(年齢 中央値 87 歳)に対して 1 週間後に造影 CT を施行し、TAVI 前後で、大動脈弁および上行大動脈にかかる wall shear stress (WSS)を解析した(図 2)。大動脈弁尖および大動脈後壁に上昇を認めていた WSS の最大値は、TAVI 後に有意に低下した。

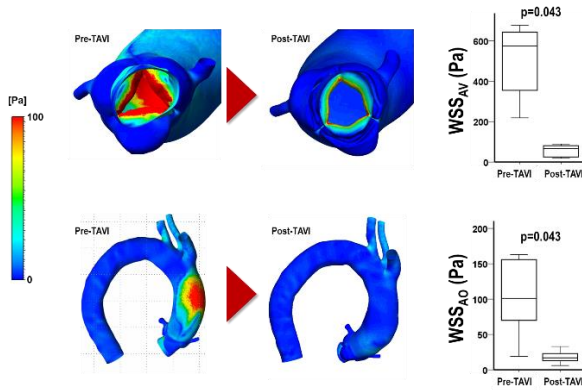


図 2 TAVI 前後でのシェアストレスの変化

【microRNA の発現】

既報(10)では microRNA-200c-3p がコントロールと比較し上昇し、microRNA-122-5p, 30e-5p, 625-5p が低下することが知られている。本研究ではいずれも有意差は認めなかったものの、miR200c-3p は経時的に低下傾向であった。

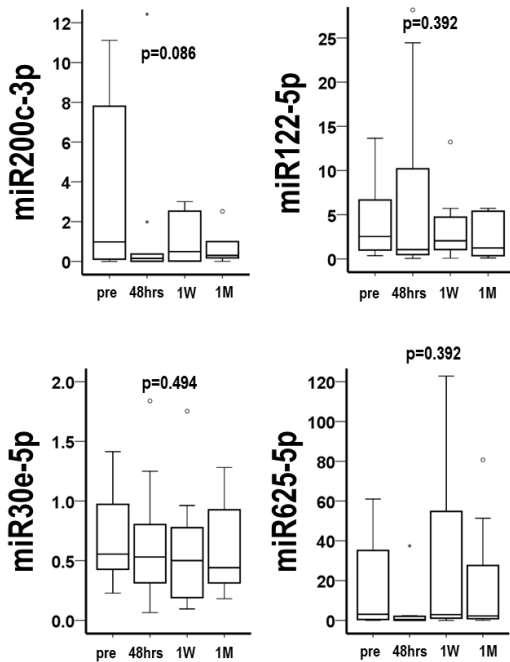


図 3 TAVI 周術期の microRNA の経時的変化

【血栓形成能、凝固能、血小板機能と圧較差の比較】

TAVI 前の血栓形成能、凝固能、血小板機能のパラメータと圧較差の関連をみるために相関関係を調べた。AR10-AUC30 は平均および最大圧較差と中等度の逆相関を認めた($r=-0.47, -0.48$)。一方、PL24-AUC10、血小板数、vWf multimer と圧較差は有意な相関を認めなかった。

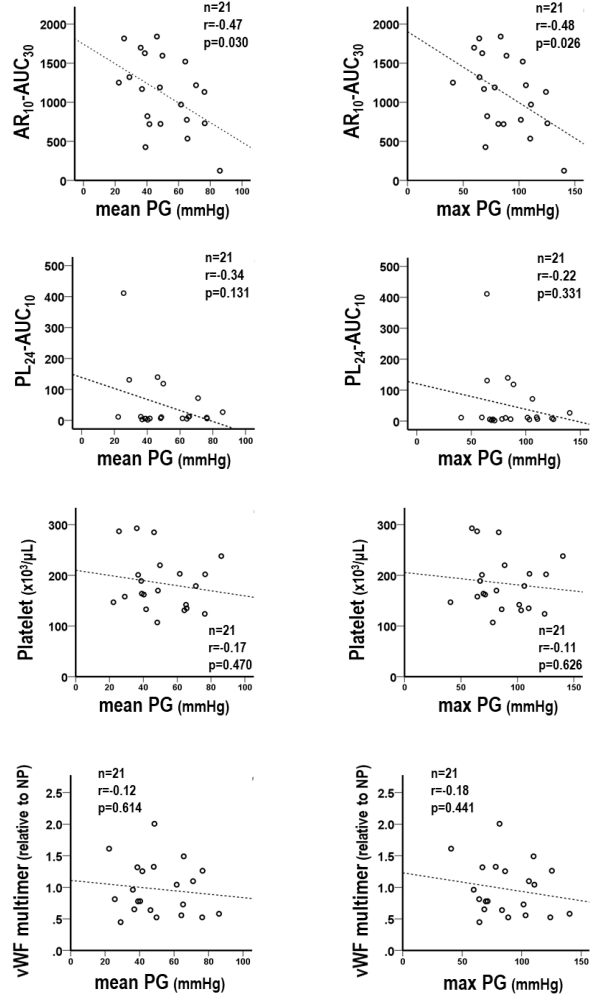


図 4 血栓形成能パラメータと圧較差の相関

【TAVI 術後アウトカム】

TAVI 術後の心エコーのパラメータと術後アウトカムを以下に示す(図 5、表 3)。図 5 に示すとおり、TAVI 術前に比べて術後に有意に平均および最大流速、圧較差は低下した。7 日以内の主要血管合併症は 2 例(9.5%)、出血合併症は 1 例(4.8%)、心タンポナーデは 1 例(4.8%)であった。30 日以内の全死亡は 2 例(9.5%)、心血管死は 1 例(4.8%)、脳梗塞は 1 例(4.8%)、恒久的ペースメーカー植え込み術は 1 例(4.8%)、心不全増悪は 3 例(14.3%)であった。

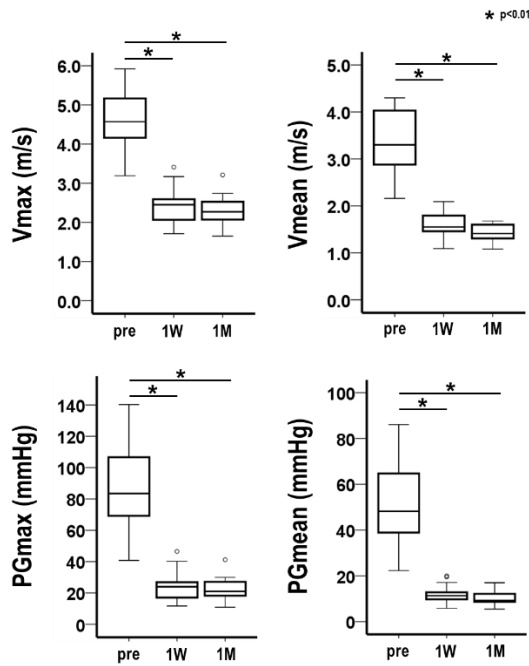


図5 TAVI前後での心エコーパラメータの変化

表3 7日、30日以内のアウトカム発生

	Overall (n=21)
7-day events	
Devisе unsuccess	0 (0.0)
Major vascular complication	2 (9.5)
Bleeding complication	1 (4.8)
New PMI / conduction disorder	9 (42.9)
Conversion to open surgery	0 (0.0)
Cardiac tamponade	1 (4.8)
Acute kidney injury	0 (0.0)
Valve embolization	0 (0.0)
Coronary obstruction	0 (0.0)
Aortic rupture	0 (0.0)
30-day events	
All-cause death	2 (9.5)
Cardiovascular death	1 (4.8)
Stroke	1 (4.8)
TIA	0 (0.0)
Myocardial infarction	0 (0.0)
Acute kidney injury	0 (0.0)
Bleeding, life-threatening	0 (0.0)
Bleeding, major	0 (0.0)
Pacemaker implantation	1 (4.8)
Worsening heart failure	3 (14.3)

IV. 考察

本研究では、TAVI 施行前後で変動する血栓形成能を T-TAS や vWF 高分子量 multimer、既存の血算や凝固能の指標で評価し、そのメカニズムとして CFD によるシェアストレスの変化と microRNA の遺伝子発現の変化を評価した。

重症大動脈弁狭窄症には、その狭窄部での高ずり応力により vWF 高分子量マルチマーが減少し、易出血性を示すが(2,3)、TAVI によって狭窄が解除されると vWF 高分子量マルチマーおよび血小板機能 (アデノシン二リン酸による閉鎖時間: CT-ADP) が弁留置直後から正常化することが報告されている(11)。しかし、経大腿アプローチによる TAVI 周術期の 30 日以内主要出血合併症の割合は、11.3%であり、外科的大動脈弁留置術(30 日以内の主要出血合併症 22.7%)に比較して少ないものの(1)、経皮的冠動脈インターベンションと比較すると高い(12)。すなわち、TAVI によって狭窄部が解除され、速やかに vWF 高分子量 multimer や CT-ADP で評価される血小板機能が改善しているにも関わらず、周術期の出血合併症が多いことは、その他に周術期の易出血性に影響を与える要因があると思われる。AR10-AUC30 は、カテーテルアブレーション周術期の出血合併症の予測に有用であることが示されているが(8)、本研究でも TAVI 後 48 時間後、1 週間後は、術前や 1 ヶ月後に比べて有意に低下しており、血栓形成能が低下し、TAVI 術後の易出血性を反映していると考えられるが、出血合併症の発症割合が少なく、AR10-AUC30 との関連を検討するには至らなかった。AR10-AUC30 はフィブリンと活性化血小板を主成分とする混合白色血栓の解析に用い、それに用いている shear rate は大動脈の壁シェアストレスを反映しており、一方、PL24-AUC10 は活性化血小板を主体とする血小板形成の解析に用い、細小血管の壁シェアストレスを反映する。本研究では、PL24-AUC10 は術前より低値であり、術後の経時的な有意な変化は認めなかったが、これは抗血小板薬の服用や血小板数の低下により PL24-AUC10 が低下するため、floor 効果で TAVI 介入による血小板血栓の形成能の変化を捉えられなかったことや TAVI で介入する大動脈弁とその近傍の大動脈の変化が、細小血管の生理的条件が反映されている PL24-AUC10 では評価しにくいことなどが考えられる。

最近、TAVI 後の血小板数減少についていくつか報告されており(13-15)、血小板数は TAVI 後 2-4 日後に最も低下し、重症で 5 万-10 万/ μ L まで低下することがわかっている。またこの重症な血小板減少が主要な血管合併症や出血合併症、1 年後の全死亡の独立した予測因子であることが報告されている(14,15)。本研究でも TAVI 前の 17 万/ μ L より 48 時間後に有意に血小板数は低下し、中央値 9.4 万/ μ L であった。その後、1 ヶ月後には 14.4 万/ μ L で改善するものの、TAVI 前よりは有意に低下していた。血小板減少の一般的な原因として血小板の消耗の亢進、生産の減少、輸血などによる希釈性などがあるが(15)、TAVI では他の PCI などの血管内治療よりも術後の血小板減少の頻度が多く、詳細な作用機序については不明である。本研究では血小板の前駆細胞の分化・増殖に関するトロンボポエチンの血漿濃度を測定し、術前より術後に有意に上昇して、血小板産生の反応を認めた。しかしながら、それでも血小板数が低下していたことは、反応性の血小板産生が相対的には低下していることや血小板の消費が産生を上回っていることが推察され、さらに詳細な機序の解明が必要である。

本研究では、TAVI 前後のシェアストレスの変化を評価するために数値流体解析(computational fluid dynamics, CFD)を行った。CFD では、患者ごとの造影 CT から 3 次元形状を構築し、そのモデルにおける血流の様相をコンピューターを用いて流体シミュレーションで再現して解析を行う(16,17)。患者ごとの造影 CT の他にも心エコーによって計測した心拍出量や弁口面積など患者条件や生理的条件を加味した上で解析を行い、できるだけ生体内の状況に近づけている。本研究では TAVI 前後でシェアストレスが変動する箇所として大動脈弁や上行大動脈の後壁であること、またそれを定量的に評価することができた。シェアストレスの改善は vWF 高分子量 multimer の改善に寄与していると思われるが、本研究で調べた microRNA では、TAVI 前後で低下傾向を示したのものがあるものの有意差は認めなかった。microRNA の発現調整には、シェアストレス以外の要因があることやサンプルサイズが少なかったこともあるため、今後、さらに症例数を増やしての検討が必要である。

V. 結論

本研究では、TAVI48 時間後に vWfmultimer は

改善したにも関わらず、総合的な血栓形成能および血小板数が有意に低下していた。AR10-AUC30 低下は出血合併症の予測に有用であることから TAVI においても有用である可能性があり、今後、さらなる検討が必要である。

VI. 研究協力者

辻田賢一 熊本大学大学院生命科学研究部・循環器内科教授

海北幸一 熊本大学大学院生命科学研究部・循環器内科准教授

老松優 熊本大学医学部附属病院循環器内科・医員

満瀬達郎 熊本大学医学部附属病院循環器内科・医員

VII. 参考文献

1. Genereux P, Cohen DJ, Williams MR et al. Bleeding complications after surgical aortic valve replacement compared with transcatheter aortic valve replacement: insights from the PARTNER I Trial (Placement of Aortic Transcatheter Valve). *Journal of the American College of Cardiology* 2014;63:1100-9.
2. Loscalzo J. From clinical observation to mechanism--Heyde's syndrome. *The New England journal of medicine* 2012;367:1954-6.
3. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 2003;349:343-9.
4. Daidone V, Barbon G, Cattini MG et al. Usefulness of the Total Thrombus-Formation Analysis System (TTAS) in the diagnosis and characterization of von Willebrand disease. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2016;22:949-956.
5. Nogami K, Ogiwara K, Yada K et al. Assessing the clinical severity of type 1 von Willebrand disease patients with a microchip flow-chamber system. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*

- 2016;14:667-74.
6. Sueta D, Kaikita K, Okamoto N et al. A novel quantitative assessment of whole blood thrombogenicity in patients treated with a non-vitamin K oral anticoagulant. *International journal of cardiology* 2015;197:98-100.
 7. Arima Y, Kaikita K, Ishii M et al. Assessment of platelet-derived thrombogenicity with the total thrombus-formation analysis system in coronary artery disease patients receiving antiplatelet therapy. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2016;14:850-9.
 8. Ito M, Kaikita K, Sueta D et al. Total Thrombus-Formation Analysis System (TTAS) Can Predict Periprocedural Bleeding Events in Patients Undergoing Catheter Ablation for Atrial Fibrillation. *Journal of the American Heart Association* 2016;5.
 9. Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;34:2206-16.
 10. Coffey S, Williams MJ, Phillips LV, Galvin IF, Bunton RW, Jones GT. Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. *Scientific reports* 2016;6:36904.
 11. Van Belle E, Rauch A, Vincentelli A et al. Von Willebrand factor as a biological sensor of blood flow to monitor percutaneous aortic valve interventions. *Circulation research* 2015;116:1193-201.
 12. Oimatsu Y, Kaikita K, Ishii M et al. Total Thrombus-formation Analysis System Predicts Periprocedural Bleeding Events in Patients With Coronary Artery Disease Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American Heart Association* 2017;6.
 13. Mitrosz M, Kazimierczyk R, Sobkowicz B et al. The causes of thrombocytopenia after transcatheter aortic valve implantation. *Thrombosis research* 2017;156:39-44.
 14. Flaherty MP, Mohsen A, Moore JBt et al. Predictors and clinical impact of pre-existing and acquired thrombocytopenia following transcatheter aortic valve replacement. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2015;85:118-29.
 15. Dvir D, Genereux P, Barbash IM et al. Acquired thrombocytopenia after transcatheter aortic valve replacement: clinical correlates and association with outcomes. *European heart journal* 2014;35:2663-71.
 16. Numata S, Itatani K, Kanda K et al. Blood flow analysis of the aortic arch using computational fluid dynamics. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2016;49:1578-85.
 17. Miyazaki S, Itatani K, Furusawa T et al. Validation of numerical simulation methods in aortic arch using 4D Flow MRI. *Heart and vessels* 2017;32:1032-1044.

血栓性脳梗塞慢性期の機能回復を促進する ミクログリア療法の確立

新潟大学脳研究所神経内科分野・講師
金澤雅人

I. 緒言

脳梗塞に対する治療は、急性期の閉塞動脈の再灌流療法と、慢性期の再発予防療法および機能回復を目指した治療に大別される。再灌流療法として、血栓溶解療法が行われおり、著者らは、これまで再灌流療法に伴う出血合併症を抑制し、その治療適応患者の増加を目指す研究を行ってきた¹⁻⁴⁾。一方、慢性期の治療としての機能回復を目指したりハビリテーションでは、半数が障害を残し⁵⁾、他に有効な後遺症改善を促進する治療もないため、新しい治療の開発が期待されている。

脳梗塞の機能回復を目指す戦略のひとつとして、梗塞部位の血管新生を促進させるという考えがある⁶⁾。血管新生を促進させる成長因子(血管・組織リモデリング因子)の一つとして、血管内皮増殖因子(VEGF)があり、VEGFの全身投与で、血管新生と機能予後の改善がラット一過性局所脳虚血(tMCAO)モデルで示されている⁷⁾。しかし、VEGFは全身投与により、低血圧・頻脈の副作用⁸⁾や、急性期では脳浮腫・出血合併が生じうる⁷⁾。また、脳には血液脳関門(BBB)があるため、特に蛋白製剤は脳内に届かず、作用しない恐れもある。そのため、血管新生を促進する治療には、副作用がなく、脳内に有効に到達する手法の開発が求められる。

近年、脳梗塞の亜急性期以降に、複数の治療標的に作用する多面的な保護効果を期待する幹細胞療法がいくつか報告されてきた⁹⁻¹³⁾。代表的な細胞として骨髄由来間葉系幹細胞があり、細胞投与後、脳梗塞病変部においてVEGFなどの成長因子を分泌し、血管新生を促進することで機能を回復させる^{12,13)}方法である。効果が期待される治療法である一方、骨髄由来の細胞を用いるため、脳梗塞後の抗血小板療法、抗凝固療法下で採取が困難であること、十分な細胞数を得るため専用の細胞調整センター(CPC)を要することなどが、臨床応用の普及の妨げになっている。

以上の状況を踏まえ、我々はミクログリアを用いた新しい細胞療法について検討を行った。ミクログリアに着目した理由は、1. VEGF, トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β , マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)-9 といったリモデリング因子の分泌源となること^{14,15)}、2. 脳梗塞後に病変辺縁に集まる性質があること^{14,15)}、3. M2 ミクログリアという保護的な性質を持つタイプも存在する^{16,17)}ため、より効果が期待できるためである。検討の結果、薬剤を使用せず、適度の低酸素低糖刺激(ODG)により、ミクログリアをM2化できること、そしてラット tMCAO モデルにおいて、そのミクログリアを亜急性期に投与することで、機能予後を改善できることを明らかにした(図1)¹⁸⁾。今回、この技術をさらに簡便な臨床応用とするため、これまで仔マウスから得ていたミクログリアを成体脳から単離できるかを検討した。さらに、細胞保護効果についてODGが低酸素あるいは低糖刺激より有効であるかどうかを検討し、脳梗塞後の機能回復を目指したODG刺激後のM2ミクログリア細胞療法の確立について、検討した。

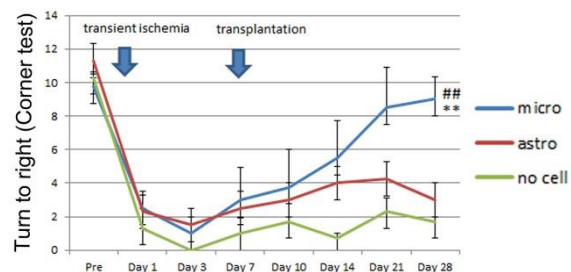


図1 M2 ミクログリア投与による脳梗塞後の機能回復
M2ミクログリア (micro) を投与した群は、ODG刺激アストロサイト群(細胞対照群, astro) (## P<0.01) と非細胞治療介入群 (no cell, **P<0.01) と比べて、コーナーテストによる評価で、虚血28日後に機能を回復した。

II. 対象・方法

1. 動物実験モデル

本研究は、新潟大学動物実験倫理委員会及び新潟大学倫理委員会の承認を受け、新潟大学動物実験指針と研究に関する倫理指針に従って実施した。オス8週令 Sprague-Dawley ラット(体重300~370g)を用いて、1.0%イソフルレン、笑気70%、酸素30%で麻酔維持し、手術を実施した。

一過性局所脳虚血は Koizumi のモデルを用い¹⁹⁾、左中大脳動脈閉塞により90分間の局所脳虚血を負荷した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開後、左総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を露出し、外頸動脈を3-0絹糸で結紮し、断端を切断した。その後、外頸動脈断端を切開し、ここよりナイロン糸の先端にシリコンコーティングを施して、直径0.35mmとした塞栓糸を挿入し、左内頸動脈から中大脳動脈起始部に留置した。90分後に塞栓糸を15mm引き抜き、中大脳動脈の閉塞を解除した。このモデルは、虚血中心とその辺縁の虚血性ペナンプラを再現性よく作製できることが報告されている²⁰⁾。

虚血中は直腸温をモニターし、常温群は体温調節マットと温熱ランプにて37.0±0.5°Cに維持した。

2. 初代ミクログリア細胞培養

初代ミクログリアの培養に、生後0~1日のC57/BL6マウス新生児の大脳皮質を用いた^{18,21)}。細かく刻んだ大脳皮質をパパイソリン溶液(Worthington Biochemical Corporation)で、37°C30分間インキュベートした後、300×gで5分間遠心し、細胞ペレットを回収した。そこに10%ウシ胎児血清を加えたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) (D6546, Sigma Aldrich)を添加し、ポリ-D-リジン5µg/mLでコーティングしたフラスコに細胞を播き、14日間培養した。培養14日目、フラスコを130rpmで15分間振動させ、培養上清中に剥がれてきた細胞をミクログリアとした。この手法により得られたミクログリアの純度は99%であることがフローサイトメトリー解析により示されている²¹⁾。

脳虚血3日後から、脳虚血病変周囲にミクログリアが集簇することを報告している⁴⁾。成体脳梗塞ラットからのミクログリアの単離では、この脳虚血3日後の大脳皮質を分離し、以下細かく刻んだ大脳皮質をパパイソリン溶液で培養し、遠心処理を行い、培養14日目、130rpmで15分間、フラスコを振動させ、ミクログリアを単離した。

単離したミクログリアはポリ-D-リジン10µg/mLでコーティングした6穴プレートに1×10⁶ cells/wellで播き、一晚インキュベートした。

3. 末梢血単核球分画分離

ミクログリアに類似した単球/マクロファージを含有する単核球を分離するため、ヒト健常ボランティアから末梢血50mLを採血し、Ficollによる分離を行った。GEヘルスケアジャパン Ficoll-Paque Premium 1.084のデータシートに従い、分離した。

4. 細胞染色

ミクログリアの染色では、メタノールで固定後、FITC-conjugated マウス・モノクローナル抗CD11b抗体(Abcam, 1:100)を用いて、4°Cで一晩反応させた。その後、DAPIで核染色を行い、全DAPI陽性中のCD11b陽性細胞数を400倍にて検鏡、計測した。

5. Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)

初代培養細胞を低酸素・低グルコース(OGD)条件に晒すことで、生体内での虚血状態を再現した。OGDの標準的な条件は、Milnerらの方法に従った²¹⁾。OGDを負荷する前に、血清入り培養液を除き、リン酸緩衝液で2回洗浄した。その後、無血清培地(4mM L-グルタミン、ペリシリン、ストレプトマイシン、N1培地を含むDMEM)を添加した。この時、コントロール群には高グルコース(4.5mg/L)培地、OGD群には低グルコース(1.0mg/L)培地を使用した。OGD群は低グルコース培地に置換後、低酸素チャンバーに入れ、1時間チャンバー内に5%二酸化炭素95%窒素の混合ガスを流し続けた。1時間後、チャンバーを完全に密封し、37°Cで18時間および24時間インキュベートした。この方法により、チャンバー内の酸素は0.1~0.4%となった¹⁸⁾。コントロール群は、高グルコース培地、ルームエアに(21%酸素)5%二酸化炭素、を加え、培養した(Normoxia群)。

6. 乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイ

OGD後の細胞死を調べるためにlactate dehydrogenase(LDH)アッセイを行った¹⁸⁾。LDHは細胞質に存在し、通常は細胞膜を通過しないが、細胞が傷害を受けることで細胞外に放出される酵素である。このLDHの性質を利用して、培養上清と細胞内に含まれるLDH量を100%とした時の、培養上清に放出されたLDH量を測定し、細胞傷害率を算出した。

LDH アッセイキット(Roche Diagnostics GmbH)を用いて、添付の説明書に従い測定を行った。

7. ウェスタンブロット法

ビスンコニン酸法にて、蛋白量を 5 μ g に調整したサンプルを Tris-glycine SDS-PAGE にて電気泳動した¹³⁾。その後、PVDF 膜に転写し、5%スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした。1 次抗体はラビット・ポリクローナル抗 VEGF 抗体(Santa Cruz, 1:200)を用いて、4°Cで一晩反応させた。リン酸バッファーで洗浄後、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ラビット 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、Chemiluminescent HRP 基質(GE ヘルスケアジャパン)にて目的とする蛋白バンドを検出した。内部コントロールとして、アクチン、トランスフェリンを用いた。

8. 統計解析

数値の解析には one-way ANOVA 法および two-way ANOVA 法を、頻度の解析には Fisher 法を用いた。全ての検定において、確立値(p)が 0.05 未満のものについて有意差ありとした。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。

III. 結果

1. 成体脳梗塞ラットからのミクログリアの単離

これまで、仔マウス脳からミクログリアを単離していたが、未検討であった成体脳梗塞ラットからミクログリアを単離することができれば、ヒトの疾患脳からも単離が可能となる。脳虚血 3 日後のラットから、プロトコルに従い、ミクログリアを単離した。その後、ミクログリアのマーカー CD11b で細胞染色を行った。結果、99%以上の細胞が、CD11b 陽性細胞であった。

2. 仔マウスと成体脳梗塞ラットから単離したミクログリアの OGD 刺激の違い

一般的に、初代細胞培養では、胎児や仔由来の細胞を用いる。成体脳から得た細胞との、viability を比較するため、OGD 後 LDH アッセイにて評価した。

OGD 刺激前の O₂ 21%、高グルコース濃度の状態でも、成体ラット由来のミクログリアでは、仔マウス由来の細胞より半数以上が細胞死を認めた ($P<0.01$)。

同様に、OGD 刺激後も、成体ラット由来のミクログリアは、仔マウス由来の細胞より有意に細胞死が増加していた ($P<0.01$) (図 2)。

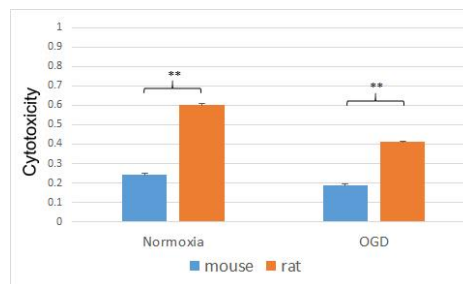


図 2 仔マウスと成体脳梗塞ラット由来ミクログリアの OGD 刺激後の細胞障害度 (** : $P<0.01$)

3. OGD 刺激後の保護的サイトカイン VEGF 分泌

OGD 刺激後の培養上清を用い、VEGF のウェスタンブロットを行ったところ、OGD 刺激によって、仔マウス由来・成体ラット由来のミクログリアどちらも VEGF の分泌量が増加した。また、OGD 刺激後の VEGF 分泌量に関して、仔マウス由来と成体ラット由来では、差を認めなかった (図 3)。

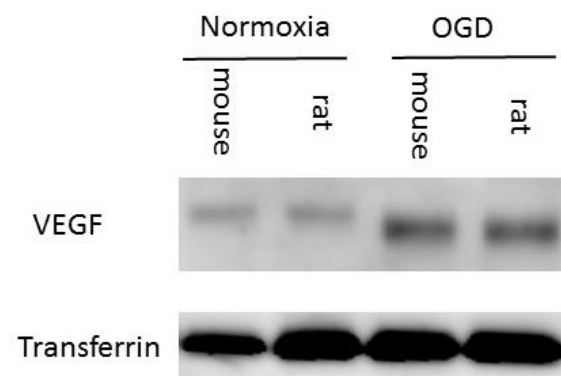


図 3 仔マウスと成体脳梗塞ラット由来ミクログリアの OGD 刺激後の VEGF 分泌量

4. OGD 刺激は、低酸素刺激、低糖刺激よりも勝る保護効果を示す可能性がある

OGD 刺激は、ミクログリアを保護的な M2 分画に極性を変えることを我々は報告している。この刺激効果が、低酸素刺激、低糖刺激より勝る相乗効果があるかを検討するため、低糖刺激として、培地を低グルコース濃度に変えて、低酸素刺激を行わなかった群 (GD 群)、低酸素刺激として、培地は変更せず、チャンバー内で低酸素に置換した群 (OD 群)、OGD 刺激を行った群、通常の糖濃度培地で、O₂ 21%で培養した群 (Nor 群) の 4 群を用いて、ミクログリアに類似した

単球/マクロファージを含む末梢血中単核球を用い、刺激後の培地中の VEGF のウエスタンブロットを行った (図4)。ODG 群は、Nor 群と比べて、VEGF 分泌量が増加していた ($P<0.01$)。また、GD 群は Nor 群と比べて VEGF 分泌量が増加しているものの、有意差はなく ($P=0.059$)、OD 群も Nor 群と違いなかった。

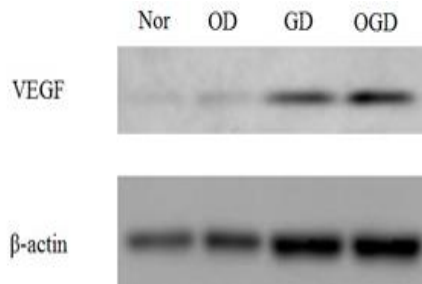


図4 低酸素低糖刺激 (ODG)、低糖刺激 (GD)、低酸素刺激 (OD) と通常酸素通常糖刺激 (Nor) 後の培地中の VEGF 発現のウエスタンブロット

IV. 考察

臨床応用を目指したとき、ミクログリアをいかに得るかが重要である。これまでは、仔マウス由来の細胞を単離していたが、成体脳梗塞ラットから採取することができれば、治療応用の可能性が広がる。今回、仔マウス由来のミクログリアの単離プロトコールに従い、成体脳梗塞ラットから、CD11b 陽性ミクログリアを単離できることがわかった。しかし、成体脳梗塞ラットから採取した細胞は、仔マウス由来の細胞と比べて、*viability* が低下する可能性があることもわかった。ウエスタンブロットの結果では、仔マウス由来と成体ラット由来のミクログリアの OGD 刺激後の VEGF 分泌量は、違いがなかった。しかし、成体ラット由来では死細胞が増加する (図2) 影響もあるのかもしれない。今後、成体ラット由来のミクログリア投与による、脳梗塞治療の効果の検証が必要である。また、脳梗塞後のミクログリアの極性は、日単位でダイナミックに変化することが示されている^{17,22)}。どの時点で、ミクログリアを得るかによっても、治療結果が変化する可能性は十分にあり、経時変化の検討も必要である。また、ES 細胞や iPS 細胞からもミクログリア様細胞、ミクログリアに分化できることが、近年示された²³⁾。このような幹細胞からミクログリアに分化誘導し、治療効果を検討することも臨床応用につながるかもしれない。

ODG 刺激は、GD や OD と比べて、保護的な成長因子 VEGF を誘導することから、治療応用に適して

いると考える。その刺激効果は、VEGF 誘導に関しては、低糖刺激が強力であった。しかし、GD よりも OGD 刺激により、より VEGF が誘導され、刺激時間の検討が必要であるものの、短時間で細胞調整が行える点からは、ODG の刺激が最適である。

ミクログリアのみならず、末梢血由来単核球でも、ODG 刺激で、保護的な増殖因子 VEGF の誘導を確認できた。臨床応用を目指す点で、末梢血由来の細胞を用いることはとても簡便で、有益である。現在、ミクログリアのみならず、ミクログリアに性質の類似した末梢血由来の細胞成分による脳梗塞治療の可能性を検討を開始した。

V. 結論

成体脳梗塞ラット由来の細胞でもミクログリアを OGD 刺激により保護的な分画に変えることができる。また OGD 刺激は、短時間で VEGF 分泌に十分な刺激を与えることができる。

VI. 研究協力者

下畑享良・岐阜大学医学部神経内科/老年科・教授
高橋哲哉・西新潟中央病院神経内科・医長
畠山公大・新潟大学脳研究所神経内科・大学院生
二宮格・新潟大学脳研究所神経内科・大学院生
小野寺理・新潟大学脳研究所神経内科・教授
尾前薫・臨床研究情報センター・専門職
木村泰子・臨床研究情報センター・専門職

VII. 参考文献

- 1) Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, et al. Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 1461–1474.
- 2) Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, et al. Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. *PLoS One* 2014; 9: e98639.
- 3) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, et al. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain* 2015; 138: 1932–1948.
- 4) Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, et al. Therapeutic strategies to attenuate

- hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. *J Atheroscler Thromb* 2017; 24: 240–253.
- 5) Winstein CJ, Stein J, Arena R, et al.; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Council on Quality of Care and Outcomes Research. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2016; 47: e98–169.
 - 6) Arai K, Jin G, Navaratna D, et al.. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J* 2009; 276: 4644–4652.
 - 7) Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106: 829–838.
 - 8) Yang R, Thomas GR, Bunting S, et al. Effects of the vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 838–844.
 - 9) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al.. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011; 134: 1790–1807.
 - 10) Taguchi A, Sakai C, Soma T, et al. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 2207–2218.
 - 11) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, et al. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 2013; 44: 720–726.
 - 12) Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain* 2011; 134: 1777–1789.
 - 13) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; 114: 330–338.
 - 14) Imai F, Suzuki H, Oda J, et al. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 488–500.
 - 15) Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, et al. Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice. *J Neurosci* 2016; 36: 4182–4195.
 - 16) Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2012; 43: 3063–3070.
 - 17) Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 174.
 - 18) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, et al. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 2017; 7: 42582.
 - 19) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japan J. Stroke* 1986; 8: 1–8.
 - 20) Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1992; 23: 552–559.
 - 21) Milner R, Hung S, Wang X, et al. Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. *Stroke* 2008; 39: 191–197.
 - 22) Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci* 2017;18: E2135.

- 23) Muffat J, Li Y, Yuan B, et al. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* 2016, 22, 1358–1367.

経カテーテル大動脈弁留置術 (TAVI)

後の経口抗凝固薬療法の確立

国立循環器病研究センター・心臓外科医師
川本尚紀

I. 緒言

経カテーテル的大動脈弁留置術 (TAVI) は、超高齢など高リスクを有する重度大動脈弁狭窄症に対する画期的な治療として急速に普及しつつある。その中で、TAVI 人工弁置換に伴う血栓形成とそれに伴う塞栓性合併症、そしてそれに対する抗血小板療法・抗凝固療法に伴う出血性合併症が大きな課題となっている。現行の欧米のガイドラインでは、TAVI 施行後早期には、抗血小板剤二剤併用療法(DAPT)を施行し、その後、抗血小板剤単剤 (アスピリンもしくはチエノピリジン系薬物) 投与を推奨している (参考文献1) が、DAPT 投与群で単剤投与群に比べて有意に出血性合併症が多いという報告もあり (参考文献2, 3)、まだ十分に確立されているとは言い難い。一方、ワルファリンもしくは直接作用型経口抗凝固薬 (DOAC) を用いた抗凝固療法が、TAVI に関連した血栓弁に対して有効であったという報告もあり (参考文献4, 5)、TAVI 術後早期から遠隔期における経口抗凝固薬療法の有用性が示唆されている。

当院では2011年にTAVIを導入し、以降200例以上のTAVIを施行してきた。当初は、ガイドラインに従いDAPTを施行したものの、脳出血など重篤な出血性合併症が見られたため、現在ではclopidogrel単剤による術後抗血小板療法を施行している。現時点では、本治療による出血性・血栓性合併症を認めていないものの、TAVI成績の向上のためには、より高いエビデンスのもとに術後抗血小板・抗凝固療法を確立することが望まれる。

一方、生体弁による弁置換後の血栓形成には、術後トロンビン生成の増加が関与していると報告されており (参考文献6)、術後のトロンビンを含めた多くの止血関連因子の変化が、抗血小板療法や抗凝固療法と関連して、血栓・出血イベントに繋がると考

えられる。そこで、本研究では、経カテーテル的大動脈弁留置術 (TAVI) 施行後の抗血小板・抗凝固療法として、経口抗凝固薬療法の安全性と有効性を抗血小板療法単独療法と比較することで検証する。また、同時に、止血関連因子の変化を定量的に測定することで、TAVI 術後の血栓・出血性合併症に関わるrisk因子を探索することを目的とする。

II. 対象・方法

本研究は、レジストリデータを用いた観察研究であり、経カテーテル的大動脈弁置換術関連学会協議会のTAVI registryのデータベースを用いて、今までに日本で行われているTAVI術後の抗血小板療法、抗凝固療法の現状について調査し、抗凝固療法併用群と抗血小板療法単独群での心機能の推移、血行動態の変化、合併症の頻度、予後について統計学的解析を加え比較検討する。合併症の評価に関してはVARC-2 (参考文献7) に基づいて評価する。また、抗凝固療法併用群での虚血性もしくは出血性合併症を起こすrisk因子を抽出する。同様に、抗血小板療法単独群での虚血性もしくは出血性合併症を起こすrisk因子を抽出する。

また、TAVI registry データベースを使用出来ない場合は、2011年12月から2017年12月までの当センターにおいてTAVIを施行された277例の患者に対して、同様の解析を施行する。

具体的には2011年12月以降に大動脈弁狭窄症に対するTAVI単独もしくは補助的な治療を併用して治療した症例について、後方視的に以下の項目について観察し検討する。

- 1) 年齢、性別、体表面積 (BSA)

- 2) 術前STS risk of mortality、STS morbidity or mortality、Euro Score 2
- 3) 既往歴：高血圧、脂質異常症、糖尿病、閉塞性動脈硬化症 (ASO)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、脳血管疾患 (CVD)、心房細動 (発作性、慢性)、PCI 既往、肝硬変、術前手術既往
- 4) 術前止血関連因子；血小板数、ヘモグロビン数 (Hb)、Fibrinogen値、D-dimer値、FDP値、AT3活性値
- 5) 術前心機能；左室拡張末期径 (LVDd)、駆出率 (EF)、僧帽弁閉鎖不全症 (MR)、大動脈弁閉鎖不全症 (AR)、大動脈弁口面積 (AVA)、経大動脈弁平均圧較差 (mPG)
- 6) TAVI：種類 (Sapient XT, Sapient 3, Core valve, Core valve evolute R)・径
- 7) 併施手術；冠動脈バイパス術
- 8) 術後経過：手術死亡・入院死亡、VARC-2に基づいた出血性合併症、梗塞性合併症、脳血管障害、心筋梗塞、感染、その他の重篤な合併症 (参考文献 7)
- 9) 術後抗血小板療法、抗凝固療法の種類
- 10) 術後心機能の推移：LVDd、EF、MR、AR、mPG、大動脈弁有効弁口面積 (EOA)

上記項目について、患者群を術後抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群で2群に分け、統計学的解析を行う。2群間の術前因子の比較には χ^2 乗検定 (もしくは、Mann-Whitney U-test、Student's t-test) を用いた。また、術後心機能の推移の比較には混合効果モデルを用いた。生存率・MACCE回避率はKaplan-Meier法を用いて評価し、log-rank 検定で有意性を検討した。出血性合併症・虚血性合併症に関するrisk因子の抽出にはCox hazard検定を用いた。

表1 抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群における術前患者背景

年齢 (才)	83.6±5.4	83.7±4.8	0.63
男性	51(27%)	41(47%)	0.001
STS risk of mortality	7.2±6.0	8.1±7.1	0.16
Euro score2	4.5±6.4	5.2±4.3	0.004
高血圧	159(84%)	67(77%)	0.16
糖尿病	52(27%)	28(32%)	0.42
脂質異常症	122(64%)	52(60%)	0.44
ASO	31(16%)	23(26%)	0.06
COPD	65(34%)	36(41%)	0.26
脳血管疾患	40(21%)	19(22%)	0.89
慢性心房細動	4(2%)	23(26%)	<0.0001
Fibrinogen	360±76	366±80	0.55
D-dimer	1.87±2.0	1.6±1.6	0.01
FDP	4.9±3.0	4.3±2.3	0.28
AT3	102±12	98±14	0.16
Cer	42±15	40±14	0.27

III. 結果

TAVI registry のデータベースからのデータの抽出は現在申請中の為、2011年12月から2017年12月までの当センターにおいてTAVIを施行した277例の患者に対する解析結果を報告する。

術後の抗凝固療法併用群は87例で、抗血小板療法単独群は189例であった。1例は、抗凝固療法・抗血小板療法のどちらも施行されなかった。

平均フォローアップ期間は抗凝固療法併用群で1.5±1.1年で、抗血小板療法単独群で1.7±1.2年であった。

抗凝固療法併用群と抗血小板療法単独群の術前背景を表1に示した。

病院死亡は抗血小板療法単独群で2例に認められたが、抗凝固療法併用群では認められなかった。

術後の経大動脈弁圧較差の推移を図1に示す。術直後では、抗凝固療法併用群と抗血小板療法単独群では有意差がないが、術後1年時には、抗凝固療法併用群で8.5mmHg、抗血小板療法単独群で10.6mmHgと抗凝固療法併用群で有意に低下した(p=0.02)。

術後のEOAの推移を図2に示す。術直後では、抗凝固療法併用群と抗血小板療法単独群では有意差がないが、術後1年時には、抗凝固療法併用群で1.83cm²、抗血小板療法単独群で1.6cm²と抗血小板

抗血小板療法	抗凝固療法	p
--------	-------	---

療法単独群で有意に低下した(p=0.001)。

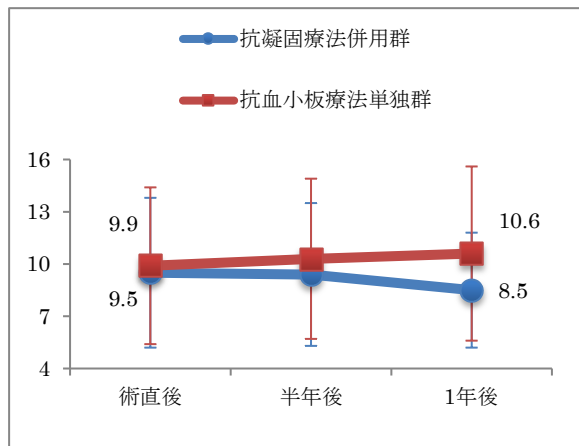


図1 抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群における、術後経大動脈弁平均径較差の推移

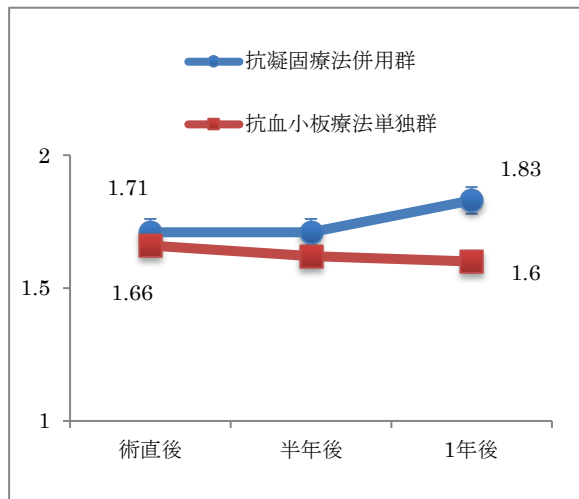


図2 抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群における、術後大動脈弁 EOA の推移

1年生存率は抗血小板療法単独群で94.7%、抗凝固療法併用群で94.6%であった(log rank p=0.38)。また、MACCEの1年回避率は抗血小板療法単独群で87.3%、抗凝固療法併用群で80.9%であった(log rank p=0.57)。

抗血小板療法単独群189例中、フォローアップ期間中に8例の出血性合併症が起り、4例に虚血性合併症が認められた。表2に抗血小板療法単独群における、出血性合併症を起こすrisk因子を示す。Cox hazard解析を用いて探索したところ、術前糖尿病、術前脳血管疾患、術後DAPTの内服をしている患者で、有意に出血性合併症が多いことが判明した。また、抗血小板療法単独群における、虚血性合併症のrisk

因子を探索したところ、術前慢性心房細動、術前脳血管疾患、術前EF低値がrisk因子と判明した(表3)。

抗凝固療法併用群87例においては、フォローアップ期間中に、6例の出血性合併症が起り、4例の虚血性合併症が認められた。表4に抗凝固療法併用群における、出血性合併症を起こすrisk因子を示す。Cox hazard解析を用いて同様に探索したところ、術前fibrinogen値の低い患者、術後ワーファリンの内服をしている患者で、有意に出血性合併症が多いことが判明した。また、抗凝固療法併用群における、虚血性合併症のrisk因子を探索したところ、有意なrisk因子は検出されなかった。

表2 抗血小板療法単独群における出血性合併症を引き起こすrisk因子

	P 値	CI	HR
糖尿病	0.007	1.6-50.3	7.3
脳血管疾患	0.034	1.1-26.3	5.1
DAPT	0.002	2.3-243.1	12.9

表3 抗血小板療法単独群における虚血性合併症を引き起こすrisk因子

	P 値	CI	HR
慢性心房細動	0.05	0.93-151.2	19.04
脳血管疾患	0.02	1.4-227.9	11.3
術前EF	0.03	0.86-0.99	0.92

表4 抗凝固療法併用群における出血性合併症を引き起こすrisk因子

	P 値	CI	HR
術前Fibrinogen値	0.02	0.96-0.99	0.97
術後ワーファリン	0.03	1.1-132.8	6.9

IV. 考察

現在のガイドラインでは、TAVI術後には脳梗塞のriskを低下させる目的で血小板療法が推奨されている(参考文献8、9)。しかしながら、TAVIを施行される患者の約30%にAfを合併しており、抗凝固療法の適応があるといわれている(参考文献10)。実際、当院においても、約1割の患者に慢性心房細動を認め、発作性心房細動も併せると、約3割の患者に抗凝固療法が併用されている。ワルファリンもしくは

直接作用型経口抗凝固薬(DOAC)を用いた抗凝固療法は、TAVIに関連した血栓弁に対して有効であったという報告があり(参考文献4,5)、TAVI術後早期から遠隔期における経口抗凝固薬療法の有用性が示唆されているが、抗血小板療法と抗凝固療法の術後心機能を比較した報告はされていない。今回、抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群での術後の心機能を比較検討したが、術直後 mPG は両群で有意差は認められなかったが、その後、抗凝固療法群では徐々に低下するのに対し、抗血小板療法単独群では、徐々に上昇することが判明した。また、有効弁口面積も術直後は両群で有意差が無いのに対して、その後、徐々に抗血小板療法単独群では減少することが判明した。術後の mPG の上昇や EOA の低下は血栓形成を示唆している可能性があるが(参考文献10)、抗凝固療法は術後の mPG の上昇や EOA の低下を抑制する可能性が示唆される。

TAVI 術後の合併症の頻度は、抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群で差はなかった。TAVI 術後の出血性合併症は DAPT の使用や、経心尖アプローチでの割合が高いといわれているが(参考文献11)、術後の抗血小板療法・抗凝固療法は多様であり、抗血小板療法単独群、抗凝固療法併用群それぞれでの出血性・虚血性合併症を引き起こす risk 因子の報告はほとんどない。今回、抗血小板療法単独群での出血性合併症を引き起こす risk 因子として、アプローチ方法は検出されなかったが、術後の DAPT の内服に強い相関が認められ、DAPT の内服は抗血小板療法単独群における出血のリスクを増大させると考えられる。また、抗凝固療法併用群での出血性合併症を引き起こす因子としては、ワーファリンの内服が検出されたが、抗凝固療法併用群でも NOAC の使用による出血のリスクは抑えられる可能性が示唆された。一方で、TAVI 術後の虚血性合併症には、低心機能や心房細動や小さい弁などが risk 因子として報告されている(参考文献12)。今回、抗血小板療法単独群での虚血性合併症の risk 因子として、慢性心房細動、脳血管疾患や術前低心機能などが検出されたが、このような術前背景のある患者に対しては、抗血小板単独ではなく抗凝固療法の併用を考慮する必要があると考えられた。

今回、術後出血性合併症・虚血性合併症の risk 因子を検出したが、両群において出血性合併症・虚血性合併症を起こした患者数は非常に少なく、今後、TAVI registry データベースを用いて大規模な研究

を行っていく必要がある。

V. 結論

抗凝固療法併用群では術後 mPG の低下や EOA の上昇が認められたが、術後の生存率や合併症発生率に関しては、抗血小板療法単独群と抗凝固療法併用群では有意差はなかった。また、抗血小板療法単独群における DAPT 内服患者では出血性合併症が上昇し、脳血管疾患や慢性心房細動・術前低心機能のある患者では、抗凝固療法併用をすることで虚血性合併症の risk を低下させる可能性がある。また、抗凝固療法併用群においても、ワーファリンの使用ではなく、NOAC の使用をすることで出血性合併症の risk を低下させる可能性がある。

VI. 研究協力者

小林順二郎・国立循環器病研究センター・院長
藤田知之・国立循環器病研究センター・心臓外科部長
福嶋五月・国立循環器病研究センター・心臓外科医長
島原佑介・国立循環器病研究センター・心臓外科医師
久米悠太・国立循環器病研究センター・心臓外科医師
松本順彦・国立循環器病研究センター・心臓外科医師
山下築・国立循環器病研究センター・心臓外科医師

VII. 参考文献

- 1) Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Baron-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2012; 33: 2451-2496.
- 2) Hassell ME, Hildick-Smith D, Durand E, Kikkert WJ, Wiegerinck EM, Stabile E, et al. Antiplatelet therapy following transcatheter aortic valve implantation. *Heart*. 2015 Jul;101(14):1118-25.

- 3) Gandhi S, Schwalm JD, Velianou JL, Natarajan MK, Farkouh ME. Comparison of Dual-antiplatelet Therapy to Mono-antiplatelet Therapy After Transcatheter Aortic Valve Implantation: Systematic Review and Meta-analysis. *Can J Cardiol.* 2015 Jun;31(6):775-84.
- 4) Pache G, Blanke P, Zeh W, Jander N. Cusp thrombosis after transcatheter aortic valve replacement detected by computed tomography and echocardiography. *Eur Heart J.* 2013 Dec;34(46):3546.
- 5) Ruparelia N, Panoulas VF, Frame A, Sutaria N, Ariff B, Gopalan D, et al. Successful Treatment of Very Early Thrombosis of SAPIEN 3 Valve with Direct Oral Anticoagulant Therapy. *J Heart Valve Dis.* 2016 Mar;25(2):211-213.
- 6) Makkar R.R, Fontana G, Jilaihawi H, Chakravarty T, Kofoed K.F, De Backer O, et al. Possible subclinical leaflet thrombosis in bioprosthetic aortic valves. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373:2015-2024.
- 7) Kappetein AP, Head SJ, Genereux P, Piazza N, van Mieghem NM, Blackstone EH, et al. Updated standardized endpoint definitions for transcatheter aortic valve implantation: the Valve Academic Research Consortium-2 consensus document. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145: 6–23.
- 8) Lung B, Rodes-Cabau J. The optimal management of anti-thrombotic therapy after valve replacement: certainties and uncertainties. *Eur Heart J* 2014;35:2942-9.
- 9) Holmes DR Jr., Mack MJ, Kaul S, et al. 2012 ACCF/AATS/SCAI/STS expert consensus document on transcatheter aortic valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1200-54
- 10) Anna F, Thomas P, Alan GH, Jonas L, Masahiko A, Fabien P, et al. Transcatheter aortic valve thrombosis: incidence, clinical presentation and long-term outcomes. *Eur Heart J* 2018;19:361-68.
- 11) Wang J, Yu W, Jin Q, Li Y, Liu N, Hou X, Yu Y. Risk factors for post-TAVI bleeding according to the VARC-2 bleeding definition and effect of the bleeding on short-term mortality: a meta-analysis. *Can J Cardiol.* 2017;33:525–534.
- 12) Davlourous PA, Mplani VC, Koniari I, Tsigkas G, Hahalis G. Transcatheter aortic valve replacement and stroke: a comprehensive review. *Journal of Geriatric Cardiology.*2018;15(1):95-104.

心臓マクロファージを基軸とする新規心内血栓形成機序の解明と新規治療標的の検索*

—アンフィレグリンによる心機能制御機構—

東京大学医学部附属病院 循環器内科 特任准教授
藤生 克 仁

I. 緒言

心臓にトラブルが生じた際には様々な全身のトラブルが生じる。心臓のポンプ失調による低拍出症候群が最も典型的であるが、それ以外にも心臓内の血栓形成によると塞栓症も患者の転機に大きな影響を与える。前者は心不全、後者は心房細動を原因とする心原性脳塞栓症という病名がつくことによって診療が展開される。我々はこれまでに心筋細胞や血管内皮細胞といった心血管疾患における中心的な細胞群ではない、非心筋細胞、非内皮細胞に着目して、非心筋細胞や自然免疫細胞であるマクロファージに着目してさまざまな生活習慣病の新しい疾患発症機序について検討を行ってきた¹⁻¹¹。この検討の中で、マクロファージを除去したマウスの心臓内に血栓が存在することを見出した。このことはマクロファージが直接的、あるいは間接的に心臓内血栓形成に関与していることを示唆する。そもそも、心臓マクロファージが定常状態や心臓への圧負荷などのストレス時にどのような役割をしているかなどは不明であり、本研究計画では、心臓マクロファージが心臓の恒常的な状態でどのような役割をしているかについて検討することを目的とする。

II. 対象・方法

今回の検討ではすべてマウスを用いて検討した。心臓疾患モデルとして腎臓集合管上皮細胞特異的 *Klf5* ノックアウトマウスを用いる。このマウスは、心臓にストレスを加えた際にストレス応答遺伝子である *Klf5* が腎臓集合管上皮細胞で発現増加するため、同細胞でノックアウトマウスを作成したところ、心臓圧負荷モデル (TAC: Transverse Aortic Constriction) を同マウスに行くと、心機能低下と心腔内血栓が生じた。その原因として心臓の圧負荷

時には、心臓内にマクロファージを中心とする炎症細胞の増加が生じるが、このマウスでは生じていなかった。すなわち、本マウスは①心臓へのストレス時に心臓マクロファージが増加しない、②心機能が低下、および③心腔内血栓の出現するという3点が同時に生じているマウスである。本マウスを用いて、心臓マクロファージと心機能、心内血栓の関係性を分子生物学的手法等を用いて解析した。

III. 結果

腎臓集合管上皮細胞特異的 *Klf5* ノックアウトマウスの心機能と血栓形成の時間経過を詳細に検討したところ、心内血栓の出現時期は TAC 後 2 か月以降であったが、それよりも早い 30 日の段階で心機能低下が表れていた (図 1)。このことから、心機能低下の結果、心内血栓が生じているものと考えた。

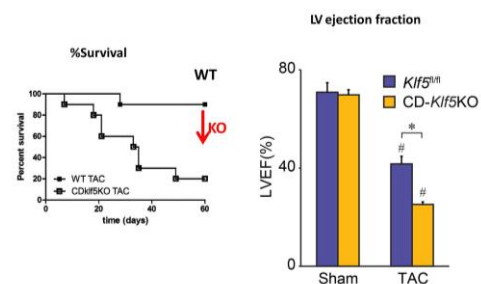


図 1 腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウス (CD:collecting duct epithelial cell- *Klf5*KO) は心機能が低下し早期に死亡する。心内血栓の出現に先行して心機能が著明に低下する。

さらに、病理像を検討したところ TAC 後 30 日では心内血栓だけではなく、冠動脈内にも血栓像はなく、本マウスの心機能低下は血栓形成に先行することが明らかとなった (図 2)。さらに、圧負荷によって通常生じる心肥大や線維化がほとんど生じていなかったため、このマウスの死亡原因は圧負荷によって生

じて起こる代償機構としての心肥大・線維化が生じないために早期に死亡しているのもであろうと思われた。

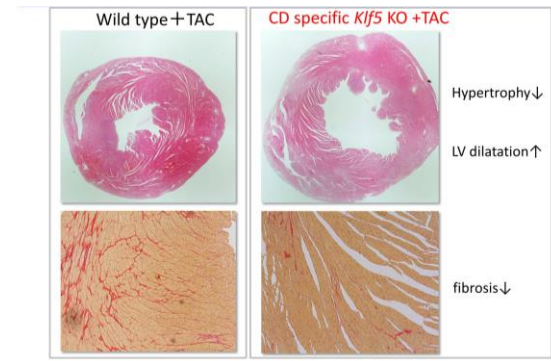


図 2 腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウス (CD-collecting duct epithelial cell- *Klf5*KO) は圧負荷に対する代償現象である心肥大や心臓線維化が生じない。また、TAC 後の 30 日では心内血栓や冠動脈内血栓は認めなかった。

次に、このマウスは TAC 時に心臓の炎症細胞が増加しないが、どのような細胞が増加しないのかをフローサイトメーターを用いて検討した (図 3)。

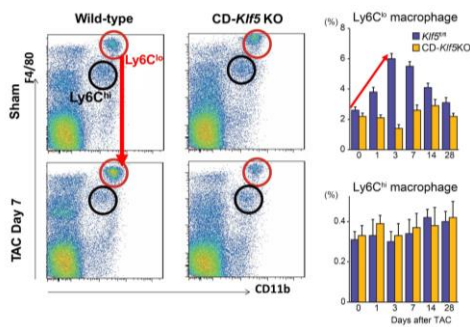


図 3 腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウス (CD-collecting duct epithelial cell- *Klf5*KO) は圧負荷時に $Ly6C^+CD11b^+F4/80^+Ly6G^-$ 細胞 (心臓内の常在マクロファージ) の増加生じない。

その結果、心臓内にもともと存在している心臓マクロファージが通常は TAC によって数倍に増加するが、この増加が全く生じないことを見出した。また、このマクロファージの増加は TAC 後 1 週間程度がピークであることから、心臓マクロファージの増加が生じないこと、心機能の低下が生じること、心内血栓が生じることが、この順に生じていることが明らかになった。

続いて、腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウスにおいて、圧負荷時に心臓マクロファージが増加しないことが、心機能低下、その後の血栓形成に寄与しているかを検討するために、腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウス、すなわち心臓に圧負荷を

行っても心臓マクロファージが増加しないマウスに対して野生型マウスから採取した心臓マクロファージを強制的に移植し、心臓マクロファージの数を増加させておく心機能の低下を生じないのかを検討したところ、野生型マウスを $Ly6c^0F4/80^{hi}$ マクロファージで強制的に心臓マクロファージを増加させておけば、圧負荷時に十分な代償性心肥大が生じ生存できた。一方で未分化な心臓マクロファージである $Ly6c^{hi}F4/80^0$ マクロファージで心臓マクロファージを強制的に増加させても、心肥大は生じずに、マウスは圧負荷後に死亡した。以上から、心臓への圧負荷によって心臓内の十分に分化したマクロファージが増加することが心機能を維持し、心内血栓を生じさせないという恒常性維持に必須であることを示唆している。さらに、十分に分化した心臓マクロファージがどのように心筋細胞に対して心肥大を生じさせるかを検討した。次世代シーケンサーを用いた網羅的解析によって、心臓内では分化したマクロファージ特異的、他の臓器のマクロファージと比較しても心臓マクロファージ特異的に発現している分泌タンパクとしてアンフィレグリン (*Areg*) を同定した。(図 4、図 5)

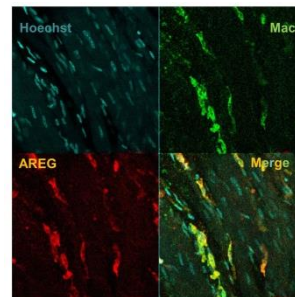


図 3 マウス心臓でのアンフィレグリンの発現、心臓マクロファージの発現と一致している。

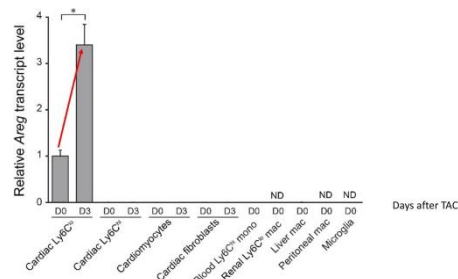


図 4 アンフィレグリンは心臓内では常在マクロファージのみ、また常在マクロファージの中では多臓器には発現がなく、心臓のみに発現している。圧負荷によってアンフィレグリンの発現が増加する。アンフィレグリンの欠損した骨髄細胞を用いて、骨

髄移植を行うと、心臓マクロファージは存在するが、アンフィレグリンの欠損した心臓マクロファージが存在する心臓を作ることができる。このアンフィレグリンの欠損した心臓マクロファージは心臓への圧負荷によって十分に増加はしたが、心機能の改善はなく、早期に死亡した (図 5)。このことから、心臓マクロファージは増加するだけではなく、アンフィレグリンが存在していることがその心臓保護的作用に必須であることが明らかとなった。

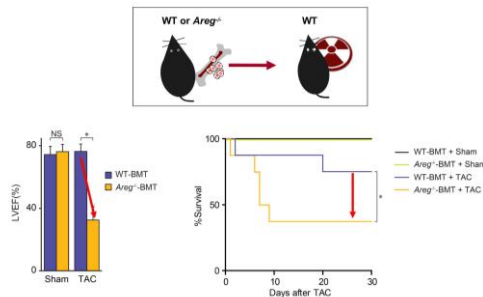


図 5 *Areg* ノックアウトマウスを用いて骨髄細胞特異的 *Areg* ノックアウトマウスを作成。常在心臓マクロファージの *Areg* が欠損すると、圧負荷時に心機能が低下し、早期に死亡する。

アンフィレグリンの心筋細胞への直接作用を検討するため、アンフィレグリンのリコンビナントタンパクを用いてマウス心筋細胞の初代培養に添加したところ、非常に強い心筋細胞肥大作用があることを確認し得た (図 6)。

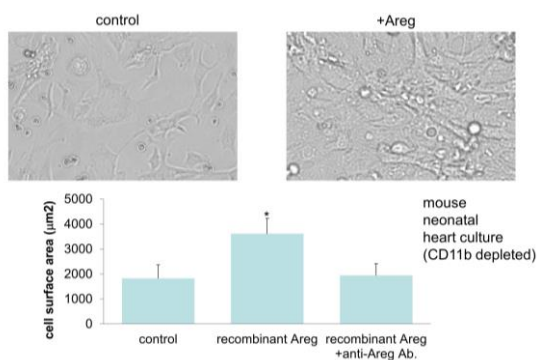


図 6 アンフィレグリンを培養心筋細胞に添加すると心肥大が生じる。

さらに、もともと本実験の予備的結果として腎臓集合管特異的 *Klf5* ノックアウトマウスは心臓圧負荷時に心臓マクロファージが増加しないという知見から始まったが、その腎臓と心臓をつなげる経路についても多くの実験を行い心臓へのストレスが神経の求心路を伝わり脳・腎臓と伝わり、最終的に腎臓の血管内皮細胞から CSF2; colony stimulating factor 2 が血中に分泌されることで心臓マクロファ

ージが増加することを見出した (図 7)。

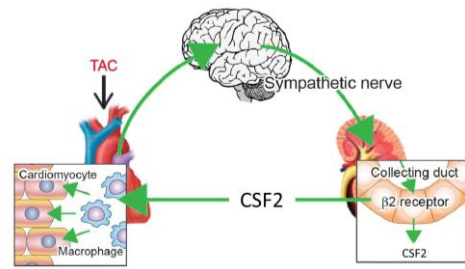


図 7 心臓への圧負荷ストレスは迷走神経求心路、脊髄後根を経由する痛覚神経の 2 経路によって脳に伝達され、そのから交感神経 β_2 を経路によって腎臓集合管上皮細胞が活性化され、最終的に腎臓血管内皮細胞から CSF2 が血中に放出され、心臓マクロファージの初期の増加が生じる。

以上から、心臓への圧負荷時に心臓・脳・腎臓の連携によって、心臓マクロファージが活性化し、心臓マクロファージが分泌するアンフィレグリンによって心臓の圧負荷応答が起り、圧に対抗していることを明らかにした。この系の何れかが欠損すると心機能低下から心不全死、あるいは心内血栓が生じることを明らかにした¹²。

IV. 考察

本研究によって心臓内にわずかし存在していない心臓マクロファージの生理的機能を明らかにした。また、この心臓マクロファージの機能が十分に発揮されるためには、心臓・脳・腎臓といった多臓器間連携が重要であることも見出した。このことは、従来心臓は全身疾患であること、心不全を改善する薬剤は腎臓にも効果的であること。腎臓が悪くなると心臓も悪くなるという心腎連関という概念などを説明し得る概念であり、今後ヒトでの検証も必要かと思われる。

V. 結論

今回私は、心臓の新しい恒常性維持機構として心臓マクロファージを中心とした心臓・脳・腎臓を介した経路を発見した。この経路の障害は、心機能低下から心不全死、あるいは心機能低下から心内血栓の出現を惹起し、疾患発症に関与している可能性を示唆している。

VI. 研究協力者

中山 幸輝・東京大学医学部附属病院・助教
 小島 敏弥・東京大学医学部附属病院・助教
 荷見 映理子・東京大学医学部附属病院・助教

杉田 純一・東京大学医学部附属病院・特任臨床医
松田 淳・東京大学大学院医学系研究科・大学院生

VII. 参考文献

- 1) 10ポイントMS明朝 英数字 century 10ポイント MS 明朝 英数字 century 10ポイント MS 明朝 英数字 century 10ポイント
- 2) 10ポイントMS明朝 英数字 century 10ポイント MS 明朝 英数字 century 10ポイント MS 明朝 英数字 century 10ポイント
1. Fujiu K, Manabe I, Ishihara A, et al.: Synthetic retinoid am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and in-stent neointima formation by inhibiting *klf5*. *Circ Res* 2005;97:1132-1141.
2. Fujiu K, Manabe I, Nagai R: Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 2011;121:3425-3441.
3. Fujiu K, Manabe I, Sasaki M, et al.: Nickel-free stainless steel avoids neointima formation following coronary stent implantation. *Sci Technol Adv Mater* 2012;13:064218.
4. Iwata H, Manabe I, Fujiu K, et al.: Bone marrow-derived cells contribute to vascular inflammation but do not differentiate into smooth muscle cell lineages. *Circulation* 2010;122:2048-2057.
5. Ogata F, Fujiu K, Koshima I, et al.: Phenotypic modulation of smooth muscle cells in lymphoedema. *Br J Dermatol* 2015;172:1286-1293.
6. Ogata F, Fujiu K, Matsumoto S, et al.: Excess lymphangiogenesis cooperatively induced by macrophages and *cd4(+)* t cells drives the pathogenesis of lymphedema. *J Invest Dermatol* 2016;136:706-714.
7. Shen H, Eguchi K, Kono N, et al.: Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2596-2607.
8. Tan X, Fujiu K, Manabe I, et al.: Choroidal neovascularization is inhibited via an intraocular decrease of inflammatory cells in mice lacking complement component *c3*. *Sci Rep* 2015;5:15702.
9. Tan X, Fujiu K, Manabe I, et al.: Choroidal neovascularization is inhibited in splenic-denervated or splenectomized mice with a concomitant decrease in intraocular macrophage. *PLoS One* 2016;11:e0160985.
10. Wang JH, Eguchi K, Matsumoto S, et al.: The omega-3 polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, attenuates abdominal aortic aneurysm development via suppression of tissue remodeling. *PLoS One* 2014;9:e96286.
11. Zempo H, Suzuki JI, Ogawa M, et al.: Influence of periostin-positive cell-specific *klf5* deletion on aortic thickening in *doca*-salt hypertensive mice. *Hypertens Res* 2016;39:764-768.
12. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, et al.: A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med* 2017;23:611-622.